

総 説

# 遺伝子発現制御系を用いた抗真菌剤の標的分子の評価

—テトラサイクリン応答性遺伝子発現制御系とその応用—

中山 浩 伸 有 澤 幹 雄

中外製薬（株）鎌倉研究所（旧 日本ロシユ研究所）

## 要 旨

遺伝子制御発現系は、遺伝子の機能解析を行うのに便利な道具として、原核生物、真核生物を問わず、多くの生物種で使用されている。しかしながら、病原性真菌では、遺伝学的背景が複雑なため、形質転換法や host-vector 系など、遺伝子操作の手法や道具の確立が遅れ、確立された遺伝子制御発現系も少ない。Candida においては、いくつかの遺伝子発現系が利用できるが、その多くは使用するプロモーターの性質上、機能しうる培養条件が限定されるなどの実験的な制約をうけている。そのため、宿主体内での遺伝子機能の解析も含め、いろいろな培養環境で使用できる、新しい遺伝子発現系の構築が期待されている。

本総説では、この問題を解決するべく構築した、テトラサイクリン応答性遺伝子発現制御系について報告する。また、この系が、ある遺伝子が抗真菌剤の標的分子になるか否かを評価するのに適した手法であるだけでなく、化合物の探索 (screening) や評価 (evaluation) にも応用可能であることも併せて紹介する。

**Key words:** *Candida glabrata*, *Candida albicans*, regulatable-promoter, essentiality, molecular target

## 1. はじめに

近年多くの生物種で、ゲノムの全塩基配列が明らかとなり、様々な生命現象が分子レベルで解析されることが期待されている。病原性真菌においても、*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* などの種でゲノムプロジェクトが進んでおり<sup>1)</sup>、*Candida albicans* では、ゲノム解析から、今までないと考えられていた、減数分裂や性接合が行われている可能性が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、全遺伝子配列を決定しても、その半数以上が機能未知であるため、これら遺伝子の機能解析がポストゲノムの次なる課題となっている。

遺伝子制御発現系は、遺伝子の機能解析を行う便利な道具として、多くの生物種で使用されており、*Candida* においても遺伝子発現系がいくつか構築されている (Table 1)。それら遺伝子発現系は、培地を交換することや、repressor または inducer となる物質を培地に添加することにより、人為的に遺伝子発現が制御できる。しかしながら、その多くは、制御するプロモーターの性質上、機能しうる培養条件が限定され、実験的に制約を受けることが少なくない。そのため、これらを使用しての、病原性に関わる遺伝子の同定や、遺伝子の宿主体内での機能および重要性を正しく予測、評価は十分とはいえず、宿主体内において制御可能な病原性真菌の遺伝子発現

系の確立が必要となっていた。我々は、*C. albicans* と *C. glabrata* において宿主体内でも機能する新しい遺伝子発現系として、テトラサイクリン (TET) またはその誘導体で制御可能な発現系を確立したので、以下に詳細を記す。

## 2. TET 応答性遺伝子発現制御系の構築

TET 応答性遺伝子発現モジュール<sup>3,4)</sup> は、TET リプレッサー (tetR) と転写因子の転写活性化領域からなる融合転写活性化因子、および TET オペレータ配列 (*tetO*) と minimal プロモーターをつないだキメラプロモーター (TET 応答性プロモーター) から構成されている。発現制御のメカニズムは以下のとおりである。TET 非存在下では融合転写活性化因子が *tetO* に結合するため、TET 応答性プロモーターが活性化され、その下流の遺伝子の発現が ON となる。逆に、TET 存在下では、融合転写活性化因子の *tetO* への結合が TET によって阻害されるため TET 応答性プロモーターの転写活性化が起こらず、結果として遺伝子発現が OFF となる (Fig. 1A)。このように、TET 応答性遺伝子発現モジュールは、外部より TET を加えるだけで転写制御ができ、さらに TET は、真菌やその宿主となる動物に対して毒性が低いことから、宿主体内における真菌遺伝子の生育の必須性を調べる目的に適している。

TET 応答性遺伝子発現モジュールは高等真核生物で盛んに用いられているが、病原性真菌ではその例がなく、プロモーター領域など転写制御に関しては高等真核生物

別刷請求先: 中山 浩伸

〒510-0294 鈴鹿市白子町

鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科

Table 1. Regulatable promoter system in *Candida*

Promoter	Applied to	Molecular switch	Gene expression ON	OFF	Reference
GAL1 galactose 1	<i>C. albicans</i>	carbon source (sugar)	galactose	glucose	15
PCK1 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	<i>C. albicans</i>	carbon source (gluconeogenic carbon)	casamino acids	glucose	16
HEX1 N-acetylglucosaminidase	<i>C. albicans</i>	carbon source (sugar)	N-acetylglucosamine	glucose	17
MAL2 maltase 2	<i>C. albicans</i>	carbon source (sugar)	maltose	glucose	18
MRP1 maltase related protein	<i>C. albicans</i>	carbon source (sugar)	maltose	glucose	19
MET3 ATP sulphate adenytransferase	<i>C. albicans</i>	amino acids	methionine or cysteine	none	20
SAP2 secreted aspartic proteinase 2	<i>C. albicans</i>	host-induced stress	BSA (bovine serum albumin)	none	21
HWP1 hyphal cell wall protein	<i>C. albicans</i>	stress related to morphological change	serum	none	22
MT-1 metallothionein I	<i>C. glabrata</i>	metal	copper	none	23
tetracycline-regulatable promoter	<i>C. albicans</i> & <i>C. glabrata</i>	tetracycline and its derivative	tetracycline	none	24,25

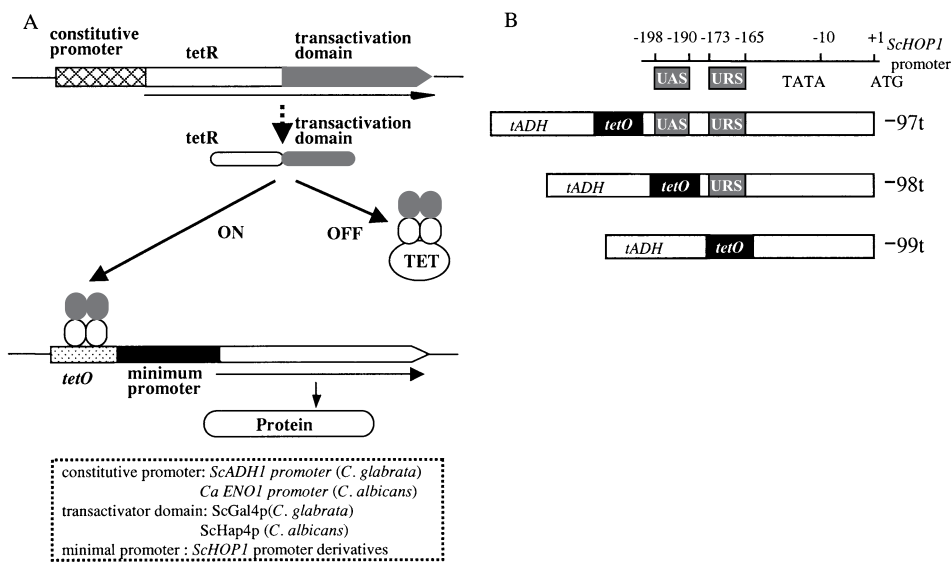


Fig. 1. Outline of TET-regulatable promoter system. (A) Schematic representation of components of the system. In the absence of TET, tetR can specifically bind *tetO* as a dimer. However, their dissociation is rapid in the presence of TET since tetR dimerization is inhibited by this small compound which possesses a high binding constant with tetR. Therefore, gene expression under this system can be actively expressed in the absence of TET by the binding of the fusion transactivator to *tetO*, and it can be repressed by adding TET, which inhibits such binding. (B) Schematic representation of TET regulatable promoters, 97t, 98t, and 99t. *tADH* is the termination sequence of *ScADH1*. Hatched boxes show derivatives of the *ScHOP1* promoter.

とは異なる点も多いことから、独自にそのユニットを作製した。まず tetR との融合転写活性化因子として *Saccharomyces cerevisiae* でその活性化の機構と活性化領域がよく知られている転写因子の Hap4p (for *C. albicans*: ref. 5) および Gal4p (for *C. glabrata*: ref. 6) を用いた。TET 制御プロモーターは、以下のように作製した。このプロモーターは TET 存在下での抑制状態が維持されていることが重要である。そこで、減数分裂期以外でその発現が常に抑制されていることが知られている遺伝子の 1 つである *S. cerevisiae HOP1* 遺伝子<sup>7)</sup> のプロモーターを、minimal プロモーターに選び *tetO* に融合させた。その際、遺伝子そのものが持つ発現量を出来るだけ反映させることを目的に、プロモーター活性が異なるように長さの違う 3 種類の *HOP1* minimal プロモーターを用意した。ま

た、上流からの転写を防ぐためにそれらの上流には *S. cerevisiae* の *ADH1* のターミネーターを置いた。その結果構築された TET 制御プロモーターを長さの長い順に 97t, 98t, 99t と名付けた (Fig. 1B)。

### 3. TET 応答性遺伝子発現制御系の特徴

TET 応答性遺伝子発現系の特徴は、短時間で目的の遺伝子発現がほぼ完全に抑制でき、また、宿主体内を含めいろいろな培養条件でそれが機能することである。この節では、これらについて、*C. albicans* の系を例に挙げて示す。

最初に、TET 応答性プロモーター、97t, 98t, 99t が、融合転写活性化因子、tetR-ScHAP4AD によってどれくらい活性化されるか、また、TET の添加によりその活性

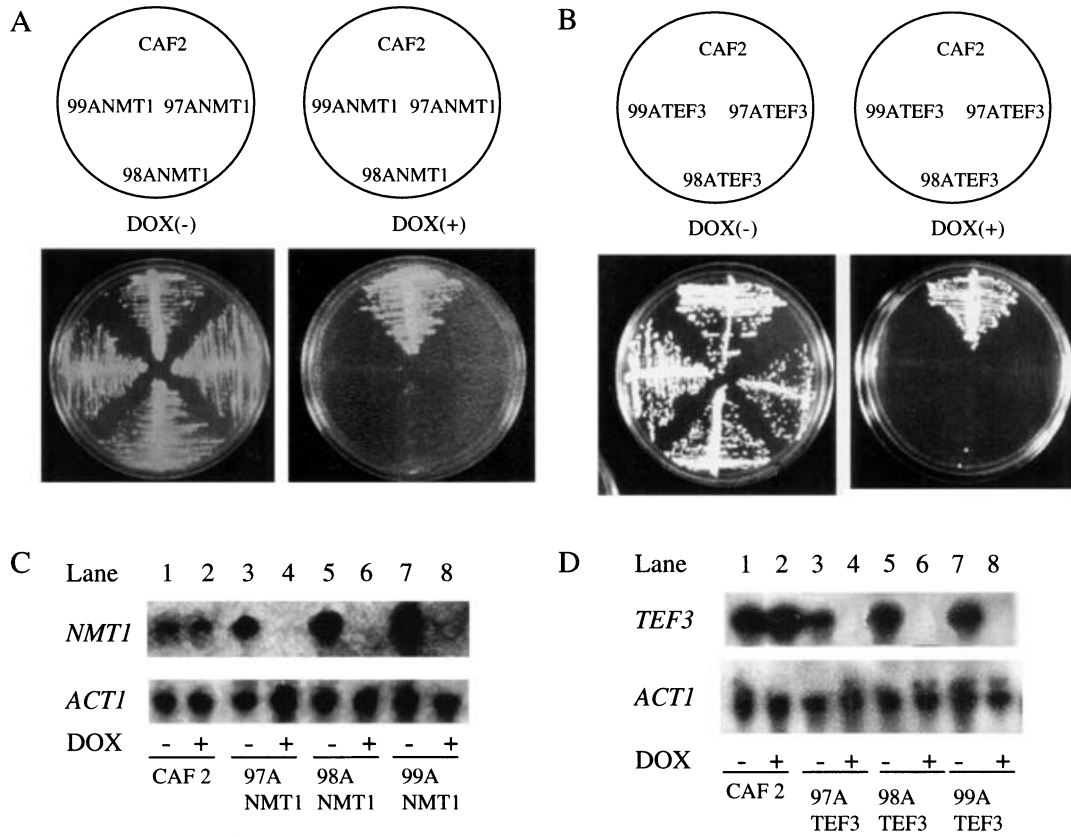


Fig. 2. Control of the *NMT1* or *TEF3* gene expression in *C. albicans* cells. (A) Effect of DOX on growth of *NMT1*-controllable strains, 97ANMT1, 98ANMT1, and 99ANMT1. Cells of each strain were plated on YPD agar (left) and YPD agar containing DOX (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (right), and incubated for 36 h at 30°C. (B) Effect of DOX on growth of *TEF3*-controllable strains, 97ATEF3, 98ATEF3 and 99ATEF3. Cells of each strain were plated on YEPD agar (left) and YEPD agar containing DOX (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (right), and incubated for 36 h at 30°C. (C) Northern blot analysis result of *NMT1*. Total RNA was prepared from cells cultured with (lanes 1, 3, 5 and 7) or without DOX (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (lanes 2, 4, 6 and 8) for 2 h. Fractionated RNA (10  $\mu\text{g}$ ) obtained by agarose gel electrophoresis was blotted onto Hybond-N and the membrane was incubated with probes for the *NMT1* and *ACT1* genes. The signal obtained from *ACT1* was used to normalize RNA signals. (D) Northern blot analysis result of *TEF3*. Total RNA was prepared from the cells cultured with (lanes 1, 3, 5 and 7) or without DOX (20  $\mu\text{g/ml}$ ) (lanes 2, 4, 6 and 8) for 2 h, Fractionated RNA (10  $\mu\text{g}$ ) obtained by agarose gel electrophoresis was blotted onto Hybond-N and the membrane was incubated with probes for the *TEF3* and *ACT1* genes. The signal obtained from *ACT1* was used to normalize RNA signals. These figures were adapted from Nakayama *et al.*, 2000<sup>25</sup>).

Table 2. DOX-regulated luciferase in *C. albicans*

Strain	Yeast form		Hyphal form	
	DOX(-)	DOX(+)	DOX(-)	DOX(+)
97RL	504.3±30.3	0.8±0.2	936.8±51.8	0.5±0.2
98RL	811.1±23.3	0.7±0.1	958.3±69.6	1.1±0.1
99RL	1003.7±178.0	2.7±0.5	1508.7±36.8	2.6±0.4
THE1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0

Values are means  $\pm$  standard deviations (three independent samples per group) for luciferase Activity. Hyphal-formed cells were cultured by YEPGlcNAc.

RLU (units/mg of total protein).

This table was adapted from Nakayama *et al.*, 2000 (ref. 24).

がどれぐらい抑制されるかを、luciferase 活性として測定した結果を示す。97t, 98t, 99t, それぞれのプロモーターに Sea pansy *Renilla reniformis* の luciferase 遺伝子<sup>8)</sup>をつなぎ、tetR-ScHAP4AD 発現株, THE1 に導入した株, 97RL, 98RL, 99RL を作製した。TET の誘導体のドキシサイクリン (DOX) 非存在下で培養し、

それら 3 株の luciferase 活性を測定したところ、Table 2 に示すように、導入したプロモーターの種類によって異なる活性を示し、97RL が一番低く、99RL が最も高い活性を保持することが分かった。このことは、これらのいずれかのプロモーターを選択すれば制御したい遺伝子そのものが持つ発現量に近い発現が可能であることを示唆している。また一方、DOX 存在下ではすべての株において、活性が DOX 非存在下時の 1/400–1/1000 に抑制されていた (Table 2)。ところで、*C. albicans* は、温度の上昇や炭素源の変化など外界からのストレスにより、酵母型から菌糸型へと形態の変化を起こす。この形態変化は、病原性と深く関わっていると考えられていることから、菌糸形成を誘導する培地での遺伝子機能解析は、重要な意義がある。そこで、YEPGlcNAc (1% yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% *N*-acetylglucosamine) または、RPMI 1640 で培養し、菌糸形成を誘導した際の TET 制御プロモーターの活性と DOX によるその抑

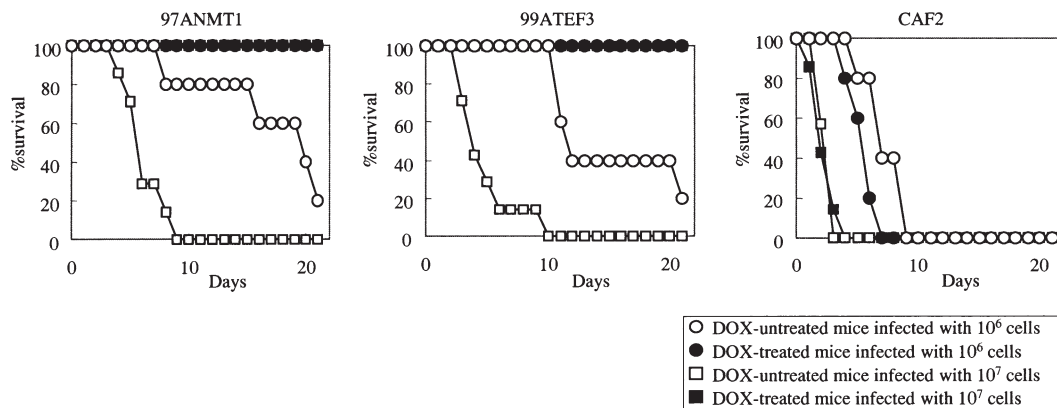


Fig. 3. Survival rate of DOX-treated or untreated mice that were inoculated with 97ANMT1, 99ATEF3, or CAF2. Mice were intravenously infected with  $10^6$  cells (circles) or  $10^7$  cells (squares). The % survival shows the ratio of the number of surviving mice to total number of mice ( $n=5$ ,  $10^6$  cells infected; and  $n=7$ ,  $10^7$  cells infected). Experiments were performed twice with the same results. These figures were adapted from Nakayama *et al.*, 2000<sup>25</sup>).

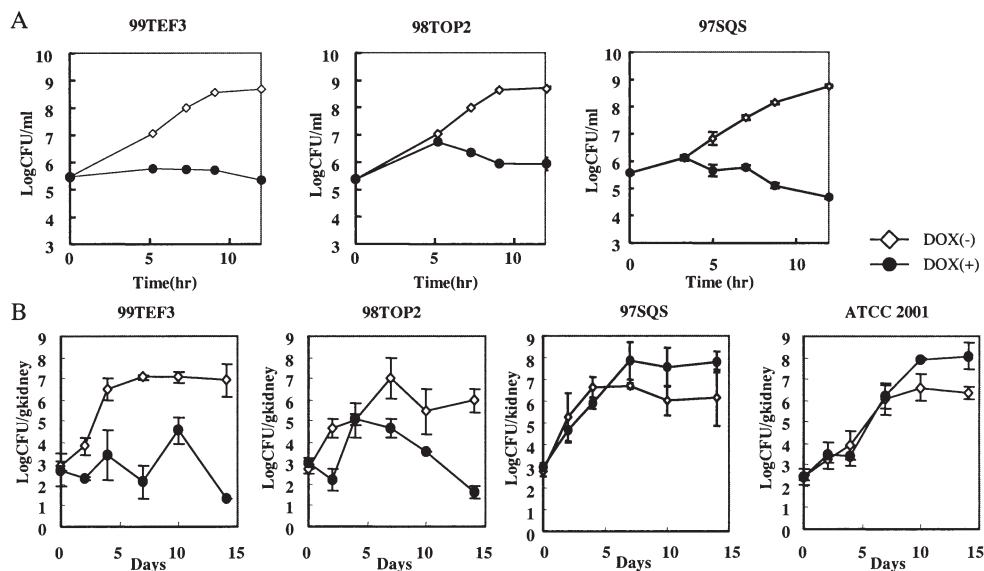


Fig. 4. Effects of DOX on the survival of 99TEF3, 98TOP2, 97SQS, and ATCC2001 in *in vitro* and *in vivo* settings. (A) Time course for the number of viable 99TEF3, 98TOP2, and 97SQS cells cultured with or without  $10 \mu\text{g/ml}$  of DOX. For each strain, approximately  $10^5$  cells were inoculated into YPD medium and cultured in the absence (open squares) or presence (closed circles) of  $10 \mu\text{g/ml}$  DOX for the indicated times. Each line represents the average of 3 independent experiments. An error bar is not shown where the symbol is larger than the error bar. (B) Effects of DOX on the survival of 99TEF3, 98TOP2, 97SQS, and ATCC2001 in mouse kidneys. Mice infected with these cells were sacrificed, and the *C. glabrata* cells in kidneys were recovered. Open squares: number of cells recovered from DOX-untreated mice; closed circles: number of cells recovered from DOX-treated mice. Each line represents the average of the number of cells recovered from 5 mice. Repeated experiments showed the same results. These figures were adapted from Nakayama *et al.*, 1998<sup>24, 26</sup>).

制についても実験を行った。その結果、菌糸型においても、酵母型と同様なプロモーターの活性とDOX添加による抑制が観察され、この発現系は細胞形態に関係なく機能することが示された (Table 2 and data not shown)。

次に、この遺伝子発現制御系が染色体上の遺伝子発現を制御でき、遺伝子の機能解析に応用できることを示す。テスト遺伝子として *C. albicans* の生育に必須とされる遺伝子のうち、翻訳に関わる *TEF3* (Translational elongation factor 3)<sup>9, 10</sup>、及び転写後修飾に関わる *NMT1* (*N*-myristoyl-

transferase 1)<sup>11</sup> の2遺伝子を選び、以下のように実験を行った。それらのプロモーターをTET制御プロモーターで置換した株を作製し、*TEF3*、*NMT1* 遺伝子の発現抑制が *C. albicans* の増殖に及ぼす影響を調べた。DOX非存在下では、親株 (CAF2) と同様な増殖を示したのに対し、DOX存在下では強い増殖阻害が観察された (Fig. 2A and B)。また、ノーザンブロット解析の結果、DOX添加後2時間以内に *TEF3* 及び *NMT1* mRNA が検出限界を下回ることが明らかとなった (Fig. 2C and D)。

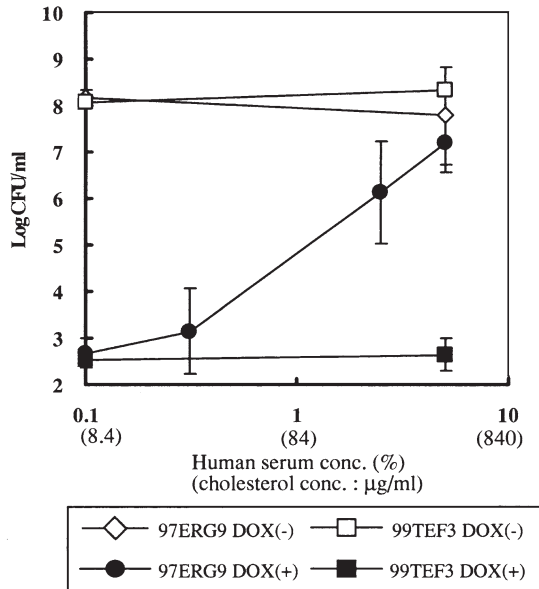


Fig. 5. Effect of added serum on the growth of 97SQS and 99TEF3 cells. For both cell lines,  $10^3$  cells were inoculated into YPD medium containing the indicated concentrations of serum and cultured in the absence and presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  DOX for 14h at 37°C. Amount of cholesterol contained in the medium is indicated in parentheses on the X-axis. Each line represents the average of 3 independent experiments. Error bars are not shown where the symbol is larger than the error bar. This figure was adapted from Nakayama *et al.*, 2000<sup>26</sup>.

このように、TET 応答性遺伝子発現系は、染色体上の遺伝子の発現をサポートでき、また DOX 添加することで、短時間で目的の遺伝子発現がほぼ完全に抑制できることが明らかとなった。

最後に、宿主動物体内においても TET 応答性遺伝子発現制御系が機能することを示す。制御している遺伝子の発現量が親株 (CAF2) とほぼ同じであるプロモーター置換株, 99ATEF3 (*TEF3* のプロモーターを 99t で置換したもの), 97ANMT1 (*NMT1* のプロモーターを 97t で置換したもの) をマウスに感染させ、DOX を飲み水 (5%スクロース溶液) に溶かし (2 mg/ml) 投与した後、マウスの生死の確認と腎臓における *C. albicans* の生菌数を測定した。その結果、DOX 非投与群では、感染後 21 日で、99ATEF3, 97ANMT1 を感染させたほとんどのマウスが死亡したのに対し、DOX 投与群では、99ATEF3, 97ANMT1 を感染させたすべてのマウスが生存していた (Fig. 3)。また、DOX を与えたマウスの腎臓内では、99ATEF3, 97ANMT1 のどちらの株もその生菌数が感染後 96 時間後では DOX 非投与群に比べて著しく減少していた (data not shown)。このように、宿主体内においても試験管内同様、DOX による *TEF3*, *NMT1* の発現抑制が *C. albicans* の生育阻害効果を引き起こしたと考えられる。このことから、構築した TET 応答性遺伝子発現制御系が、宿主内に感染している事における真菌遺伝子の機能解析にも応用できることが判明した。

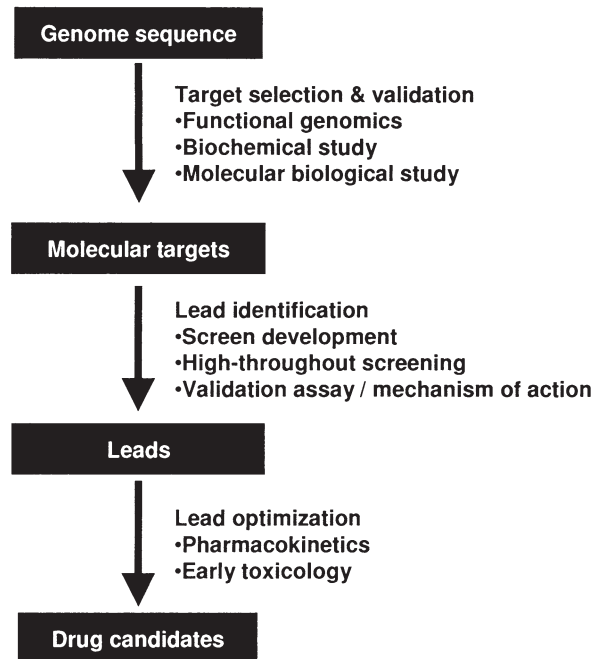


Fig. 6. Schematic representation of target-based drug discovery process.

#### 4. 遺伝子発現制御系の創薬への応用 (その 1: 抗真菌薬の標的分子の選定)

抗真菌薬の開発に限らず、標的分子を定めた創薬は、既存の薬剤と異なる作用機作を持つ新薬の開発の strategy (戦略) である。近年、多くの生物種でゲノムの全塩基配列が明らかとなったため、数千を越える遺伝子の中から、新薬の標的分子となる候補遺伝子を選ぶことが可能となった。このことも手伝って、様々な疾病治療薬の開発において、この strategy が盛んに遂行されている。抗真菌薬の標的分子となるような分子を選定する場合、その分子の生育に対する必須性、ヒトと比べての特異性、病原性への関与などが判断基準となる。特に必須性に関する情報は、選定基準の中でも最も重要なものとなる。しかしながら現状では、宿主体内の環境とは大きく違う試験管内での情報や、遺伝子操作が確立している近縁種の *S. cerevisiae* における研究情報を基に必須性を判断しており注意が必要である。この節では、宿主体内においての必須性を調べるのが重要であり、その目的には、構築した TET 応答性遺伝子発現制御系が適していることを *C. glabrata* の系を用いて得られた結果を例として紹介する。

Fig. 4 は、TET 応答性遺伝子発現制御系を用いて、抗真菌薬の標的分子として有力と考えられている、DNA 複製や染色体分離に関与するトポイソメラー II (*TOP2*)、翻訳に関わるペプチド伸長因子 3 (Translational elongation factor 3: *TEF3*)、ergosterol 合成に関わる squalene 合成酵素 (*ERG9*) の生育に対する必須性を調べた結果を示している。それぞれ、プロモーター置換株, 99TEF3 (*TEF3* のプロモーターを 99t で置換したもの),

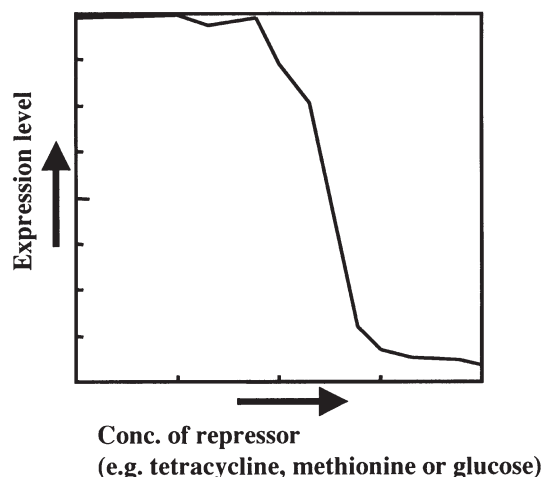


Fig. 7. Correlation of expression level with concentration of repressor molecule in a regulatable promoter system.

98TOP2 (*TOP2*のプロモーターを98tで置換したもの)、97SQS (*ERG9*のプロモーターを97tに置換した株)を作製し、DOX添加の影響を調べた結果、*TEF3*や*TOP2*は宿主体内においても試験管内同様生育に必要であることが分かった。このことから、*TEF3*、*TOP2*遺伝子が抗真菌剤の標的分子として適した遺伝子であると考えられた。しかしながら、*ERG9*は、マウス体内に感染した場合は試験管内と異なり、生育に必要でないことが示されたため、*ERG9*が、*C. glabrata*感染治療薬の標的分子として適していないことが示唆された。このように、遺伝子の生育に対する必要性が試験管内と宿主体内とで異なる場合があり、抗真菌剤の標的分子としての適性を評価する場合、宿主内の状況を反映する形で評価する必要があることが示された。

さらに我々は、*ERG9*がマウス体内の生育に必要でない理由を以下のように検討した。試験管内と宿主体内での違いを考えると、宿主体内の場合、squaleneなどのsterol合成の中間体やcholesterolなどの脂質が存在するため、*C. glabrata*がそれを取り込み同化する能力を持ち合わせていれば、マウス体内での*C. glabrata*の生育に*ERG9*が必須でないと考えられる。そこで、*ERG9*の発現を抑制した場合のsterol及びsqualeneの取り込みを調べた。その結果、squalene (50  $\mu$ g/ml)、lanosterol (20  $\mu$ g/ml)、cholesterol (20  $\mu$ g/ml)、或いはergosterol (20  $\mu$ g/ml)を単独でDOXを含む培地に添加してもこれらの取り込みが見られず、*C. glabrata*は生育しなかった。しかしながら、リポ蛋白質として高濃度にcholesterolを含むヒト血清を添加したところ、*ERG9*抑制下でも*C. glabrata*は生育可能であった (Fig. 5)。さらに、血清を含む培地と含まない培地で培養した97SQSのsterol組成の分析を行ったところ、DOXを含む培地では、*ERG9*の発現が抑制されるためergosterolの含量の低下のみが観察されたが、DOXと血清の両方を含む培地では、ergosterolの減少と引き換えにcholesterolの蓄積が認められた (data not shown)。これらのことから*C. glabrata*

は、血中よりsterolを取り込み、これを同化できる能力を有していることが示された。この能力を持ちあわせていることが、マウス体内での*C. glabrata*の生育に*ERG9*が必須でない理由であると考えられた。またこのことは、ergosterolの枯渇を引き起こすような既知の薬剤が、深在性真菌症の治療に効果がないことを示唆しており、ergosterolの枯渇により細胞死を引き起こすsqualene epoxidase (*ERG1*)阻害剤のallylamineやmorpholine、piperidineといったsterol  $\Delta 14$ -reductase (*ERG24*)、 $\Delta 8 \rightarrow 7$  isomerase (*ERG2*)阻害剤が白癬等の表在性真菌症には効果を示しながら深在性真菌症に効果を示さないことをうまく説明している<sup>12,13</sup>。このように、TET応答性遺伝子発現制御系を用いることで、既知の薬剤に対する真菌の耐性の機構を解明することや、真菌の感染治療には使われていない薬剤の効果を予測するも可能であることが考えられる。

## 5. 遺伝子発現制御系の創薬への応用 (その2:化合物の screening への応用)

この節では、遺伝子発現制御系が、標的分子を定めた創薬において、上記以外にも応用可能であることを紹介する (Fig. 6)。

遺伝子制御発現系では、repressorの濃度によって遺伝子の発現量を調節することが可能である (Fig. 7)。そのため、化合物の標的となる遺伝子のプロモーターを遺伝子発現系のプロモーターに置き換えた株、プロモーター置換株を作製することで、容易にその化合物に対しての感受性を変化させることができる。すなわち標的遺伝子の発現量を減らすことで、プロモーター置換株を、制御プロモーターの支配下に置いた遺伝子の転写産物の機能を阻害する薬剤に対する感受性株として使用することが出来るようになる。このような株を化合物の screening に用いることで、使用する化合物を節約できるようになるだけでなく、通常、*in vitro*の再構築系を用いて行う、目的の遺伝子産物の機能を阻害する化合物の screening (mechanism-based screening) が、真菌細胞レベルで可能となる。このほかプロモーター置換株は、screeningで選ばれた化合物の作用点を確認することにも、応用できる。つまり、作用点と考えられる遺伝子の発現量を、発現制御プロモーターを使って変化させることで、プロモーター置換株の化合物に対する感受性が変化するかどうかをみれば、その確認ができる。このように、遺伝子制御発現系は、標的分子を定めた創薬における、標的分子の選定、評価のステップに利用できるだけでなく、化合物の単離やその特徴づけのステップにも応用可能であると考えられる (Fig. 6)。特に、プロモーター置換株を用いての cell-based screening は、*in vitro*の再構築系を作製するのが困難である時や、標的分子としてゲノム情報などから選んだ遺伝子産物の機能が未知である時でも、化合物の screening が実現可能であるため、ゲノム創薬において有用なアイテムになると期待できる。

## 6. 最 後 に

本稿では、テトラサイクリン応答性遺伝子発現制御系が、宿主体内を含め、種々の培養条件で機能可能であり、ある遺伝子が抗真菌剤の標的分子になるか否かを評価するのに適した手法となることを示した。また、これを用いて作製した株が、cell-based screening や新規薬剤のリードとなる化合物の作用点の探索など、分子標的を定めた創薬におけるいろいろなステップで利用可能であることを紹介した。

テトラサイクリン応答性遺伝子発現制御系の確立によって、今まで証明が困難であった遺伝子の生育に対する必須性が容易に判断できるようになるなど、*Candida* の遺伝学的、分子生物学的研究の効率が高まると考えられる。しかしながら、早くから形質転換法や host-vector 系など、遺伝子操作の手法や道具の確立している病原性細菌に比べると、遺伝学的、分子生物学的解析が追いついたとは言い難い。事実、真菌と宿主細胞との相互作用はほとんど解明されていないが、サルモネラ菌などのグラム陰性菌では、宿主への感染機構や感染後の挙動（どのように、宿主細胞からの攻撃から逃れているか）が、分子レベルで解明されはじめて<sup>14)</sup>。今後真菌においても、このような宿主との相互作用の分子レベルでの解析が、テトラサイクリン応答性遺伝子発現制御系などを使って行われ、真菌感染の治療や予防の研究の発展に寄与することを期待したい。

## References

- 1) 知花博治, 三上 襄: *Candida albicans* におけるゲノム解析. 真菌誌 **44**(2): 81-85, 2003.
- 2) Tzung KW, Williams RM, Scherer S, Federspiel N, Jones T, Hansen N, Bivolarevic V, Huizar L, Komp C, Surzycki R, Tamse R, Davis RW, Agabian N: Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA **98**: 3249-53, 2001.
- 3) Gossen MA, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoter. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 5547-5551, 1992.
- 4) Gossen M, Bonin AL, Bujard H: Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory element. Trends Biochem Sci **18**: 471-475, 1993.
- 5) Forsburg SL, Guarente L: Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. Genes Dev **3**: 1166-1178, 1989.
- 6) Johnston M: A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev **51**: 458-476, 1987.
- 7) Hollingsworth NM, Goetsch L, Byers B: The *HOP1* gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. Cell **61**: 73-84, 1990.
- 8) Matthews JC, Hori K, Cormier MJ: Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. Biochemistry **16**: 85-91, 1977.
- 9) Di Domenico BJ, Lupisella J, Sandbaken M, Chakraborty K: Isolation and sequence analysis of the gene encoding translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. Yeast **8**: 337-352, 1992.
- 10) Myers, KK, Fonzi WA, Snyder PS: Isolation and sequence analysis of the gene for translation elongation factor 3 from *Candida albicans*. Nucleic Acids Res **20**: 1705-1710, 1992.
- 11) Weinberg RA, McWherter CA, Freeman SK, Wood DC, Gordon JI, Lee SC: Genetic studies reveal that myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferase is an essential enzyme in *Candida albicans*. Mol Microbiol **16**: 241-250, 1995.
- 12) Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Sen Gupta S, Improvisi L, Marichal P, Odds FC, Provost F, Ronin O: Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. J Med Vet Mycol **32**: Suppl 1: 189-202, 1994.
- 13) Kelly DE, Rose ME, Kelly SL: Investigation of the role of sterol delta 8->7-isomerase in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to fenpropimorph. FEMS Microbiol Lett **122**: 223-226, 1994.
- 14) Galan JE, Zhou D: Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 8927-8932, 2000.
- 15) De Backer MD, Nelissen B, Logghe M, Viaene J, Loonen I, Vandoninck S, de Hoogt R, Dewaele S, Simons FA, Verhasselt P, Vanhoof G, Contreras R, Luyten WHML: An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. Nat Biotechnol **19**: 235-241, 2001.
- 16) Leuker CE, Sonneborn A, Delbruck S, Ernst JF: Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. Gene **192**: 235-240, 1997.
- 17) Mio T, Yamada-Okabe T, Yabe T, Nakajima T, Arisawa M, Yamada-Okabe H: Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* *KRE6* and *SKN1*: expression and physiological function. J Bacteriol **179**: 2363-2372, 1997.
- 18) Backen AC, Broadbent ID, Fetherston, RW, Rosamond JD, Schnell NF, Stark MJ: Evaluation of the *CaMAL2* promoter for regulated expression of genes in *Candida albicans*. Yeast **16**: 1121-1129.
- 19) Munro CA, Winter K, Buchan A, Henry K, Becker JM, Brown AJP, Bulawa CE, Gow, NAR: Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of septum and cell integrity. Mol Microbiol **39**: 1414-1426.
- 20) Care RS, Trevethick J, Binley TM, Sudbery PE: The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. Mol Microbiol **34**: 792-798.
- 21) Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhauser J: Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. Proc Natl Acad Sci USA **97**: 6102-6107, 2000.
- 22) Uhl MA, Johnson AD: Development of *Streptococcus thermophilus lacZ* as a reporter gene for *Candida albicans*. Microbiology **147**: 1189-1195, 2001.
- 23) Thorvaldsen JL, Mehra RK, Yu W, Sewell AK, Winge DR: Analysis of copper-induced metallothionein expression using autonomously replicating plasmids in *Candida glabrata*. Yeast **11**: 1501-1511, 1995.

- 24) Nakayama H, Izuta M, Nagahashi S, Sihta EY, Sato Y, Yamazaki T, Arisawa M, Kitada K: A controllable gene-expression system for the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* **144**: 2407-2415, 1998.
- 25) Nakayama H, Mio T, Nagahashi S, Kokado M, Arisawa M, Aoki Y: Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 6712-6719, 2000.
- 26) Nakayama H, Izuta M, Nakayama N, Arisawa M, Aoki Y: Depletion of the squalene synthase (*ERG9*) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2411-2418, 2000.

## Evaluation of Targets for Antifungal Drugs Using A System to Regulate Gene Expression

Hironobu Nakayama, Mikio Arisawa

Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. (previously known as Nippon Roche Research Center)

A system to regulate gene expression is a convenient tool to explore gene function(s) not only in prokaryote but also in eukaryote. Such manipulation tools are scarce in the medical mycology field due to its complexity and diploidy. Although systems to regulate gene expression have been constructed, most of them are restricted in their application to particular culture conditions due to the nature of the promoter used. This motivated us to establish a new regulatable expression system that can function regardless of culture conditions, including in a host. In this review, a new system using tetracycline or its derivative as a molecular switch is introduced, which can function in several culture conditions, and in a host. We also show that the system can be applied to the selection of antifungal drug targets, which is the first step in a target-based strategy for drug discovery.

---

この論文は、第46回日本医真菌学会総会の“シンポジウムⅢ：カンジダ属の Molecular Mycology: 臨床医にも必要な最近のトピックス”において発表されたものです。